

## 論文の内容の要旨

論文題目 多能性幹細胞から中胚葉系譜への分化経路シグナルの同定

氏名 遠藤 大

ヒト多能性幹細胞(human Pluripotent Stem Cell; hPSC)は生体外 (in vitro) での半永久的な自己複製能と多分化能を持ち、個体を構成する3胚葉系統全ての細胞になる可能性を有する。また、hPSCは個体発生過程上のエピブラスト状態に相当しているためPSCからの分化過程観察は、個体発生におけるエピブラスト以降の発生過程を再構成でき得る。以上からhPSCは再生医療応用・発生学研究領域で有用である。

既知の発生学的な知見を基本に、多くのhPSCからのin vitro分化法が開発されてきた。しかし、マウスとヒトでは様々な面で異なる場合が存在し、マウスモデル動物の解析を通じた初期発生過程の観察技術の改良から得た知見をヒトにそのまま当てはめることも難しいことから、実際のヒトの初期発生過程には未知の部分が多い。hPSCを用いた再生医療への応用では、目的の種類に分化させた細胞を細胞療法ソースとして用いることが想定されるが、未知のメカニズムによって分化制御に問題が生じる可能性は安全性と有効性の保証の観点から懸念されるべきである。従って、hPSCの分化系譜決定メカニズムを詳細に解明することは、基礎生物学的観点および臨床応用の面からも急務と結論付けられる。

血球系は生命維持に必須の組織である。発生において最初期の血球は卵黄囊の血島と呼ばれる構造に出現することが明らかになっている。エピブラストから生じる初期線条を介してできる、胚外中胚葉がその起源であるとされる。マウスではこの過程にNodal/ActivinA/Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ )、Bone morphogenetic protein 4 (BMP4)、canonical WNTシグナルが重要な役割を果たしている。しかし前述のようにhPSCから血球を分化誘導する方法は散見されているものの、分化初期ステップに当たる中胚葉の誘導分子メカニズムは解明されていない。

そこで私は、既知の分化シグナルの候補分子を含む細胞外刺激を誘発する各種の増殖因子、サイトカインなどを組み合わせ、hPSCから中胚葉を誘導した上で、各種の組み合わせ条件下における中胚葉由来の血球産生能力を最終評価することで、hPSCから血球までの経路と分化メカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果として、血球分化系譜は、予想に反し、複数の経路があることを発見した。

先ず、私が所属する研究室において確立された既知の‘血球分化を促進する’培養方法を基本とし、hPSC由来の発生段階各の細胞を同定・追跡できるシステムを新たに構築した。具体的には、多能性段階から分化開始した3-4日目で中胚葉系細胞であるCD56+APJ+細胞を同定・単離可能であること、さらに5-7日目で血球血管前駆細胞分画であるCD34+細胞、8日目以降に血球細胞の細胞表面マーカーであるCD43+細胞を再現よく捕捉できることを証明した。即ち、hPSCから血球までの経路上、4つの分化ヒエラルキーステージと、それらを繋ぐ3つのステップが存在することを明らかにした。

次に、各分化ステージの細胞集団の誘導効率を指標として分化系の評価・改善・再構築を検討した。初期ステップではマウス発生学の知見から、TGFβシグナル、BMP4シグナル、canonical WNTシグナルの重要性を考察しており、それらのアンタゴニスト・阻害剤を用いた介入操作を実施した。結果として、TGFβシグナルを阻害した時にCD56+APJ+細胞の出現がほぼ完全に抑制され、BMP4とcanonical WNTシグナルをそれぞれ阻害した際にも出現が抑制されたが限定的な影響に留まった。これらのことから、TGFβシグナルは中胚葉系への分化に支配的な役割を果たしており、BMP4とcanonical WNTシグナルは補助的に中胚葉への分化を制御することを明らかにした。

さらに、血球細胞低効率産生の問題点を改善するために、VEGFに加えてbFGFを追加し、TGFβシグナル遮断と組み合わせる新規の方法を発見した。この方法は、既存の方法と比較し、40倍高い血球分化効率を達成し、分化効率の問題を解決した。

中胚葉ステージからの更なる分化能力を調べる方法として、分化ステージの途中で中胚葉集団を純化した系を構築し血球分化能評価系を改善することにも成功した。Day4で出現したCD56+APJ+細胞の単離は、全細胞の20-60%が血球に分化できる高効率な系となった。

以上の分化評価系の新規構築を元に、さらに真の中胚葉自体の血球分化ポテンシャルを評価するための血球分化系を再構築した。未知の因子による影響をなるべく除去するため全工程での無フィーダー化と初期ステップでの無血清化を行い、また増殖因子を組み合わせることで初期ステップにおける因子同士の関係や必要性について検証した。その結果、ActivinA + BMP4 (AB) または ActivinA + canonical WNT (AC) シグナルの2つの組み合わせは高効率な血球産生が可能である血球前駆中胚葉を誘導出来たのに対し、ActivinA + BMP4 + canonical WNTシグナルの3つ全てを入力した場合(ABC)には、中胚葉はできるものの血球分化能が著しく低下していた。これらの結果から、hPSCから血球までには血球前駆中胚葉という中間段階を経る必要があり、複数のシグナル組み合わせによってこれは達成されるが、組み合わせによっては血球分化ポテンシャルを持たない中胚葉が誘導されてしまうことが分かった。

分子メカニズムを探るために、day4のCD56+APJ+細胞をAB, AC, ABC条件で回収し、遺伝子発現アレイ解析を行った。すると、AB, AC, ABC全てにおいて中内胚葉に特徴的とされる遺伝子群の発現上昇が確認され、全ての条件で中内胚葉系への分化が達成されたことが確認された。しかし、AB, ACとの比較で、ABCにおいて特徴ある複数の遺伝子の発現上昇が認められた。これらは、純粹に血球細胞を生み出すことには貢献しないグループの遺伝子群であり、興味深い。以上のことから、TGFβシグナル存在下でBMP4とcanonical WNTシグナルの両方が揃った場合にのみこれらの転写因子が上昇し、血球系以外の中胚葉細胞として運命決定がなされる可能性が示唆された。一方で、ABとAC条件から誘導した中胚葉をさらに分化させて得られたday14でのCD43+細胞を同様に遺伝子発現アレイ解析したところ少数ではあるが血球分化に関わる遺伝子群に発現の差を認めた。即ち、異なる経路で誘導された血球前駆中胚葉に由来する血球間には分化ポテンシャルに差がある可能性を示唆した。

ヒト発生初期過程はアクセスの困難さから、今後も知見を直接に得ることは難しいことが予想され、分化分子メカニズムの解明には代替法を必要とする。ヒト発生過程を模倣するとされるhPSCを用いたin vitro分化系は、モデル動物を用いた研究と並ぶ有力なツールである。今回、血球発生においてモデル動物から得られていた知見を元に分化系の再構成を試みた結果、モデル動物の研究からだけでは明らかではなかった新た

な知見を得ることが出来た。先ず、本研究によって hPSC を用いた *in vitro* 分化系を研究することの意義を証明した。*In vitro* 分化系において最終産物までの経路が複数存在することが、本来の発生過程においてどのような意味を呈示するのか不明であるものの、*in vivo* 内部での血球発生の安定性や血球とその他の近縁細胞種との相互作用を探る上で重要な知見であることが示唆される。また、初期のシグナルの影響が顕在化するのにより時間が経過した段階においてであることから、分化させた細胞の特性を知るためにはその瞬間での解析だけでは不十分であり、細胞が辿ってきた系譜をきちんと制御できる方法を確立することはさらに重要な命題と言える。hPSC を用いた細胞療法の製造法開発研究においても、本研究の知見は大きく貢献できる。